

ИНФОРМАТИВНОСТЬ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ТЕСТОВ ПРИ ПОДТВЕРЖДЕНИИ ДИАГНОЗА ЛИХОРАДКИ ЗАПАДНОГО НИЛА

**Т.В. Замарина^{1,2}, Н.П. Храпова¹, И.А. Баркова¹, Е.В. Пименова^{1,2}, Ю.А. Кузютина^{1,2},
Г.А. Ткаченко^{1,2}, А.А. Батури^{1,2}, Л.В. Лемасова^{1,2},
М.Л. Леденева¹, Н.Н. Тетерятникова¹**

¹ ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора»;

² ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет»

Министерства здравоохранения Российской Федерации

Для лабораторного подтверждения диагноза лихорадки Западного Нила (ЛЗН) использовали иммуноферментный анализ (ИФА) и полимеразную цепную реакцию (ПЦР) согласно МУК 4.2.3009-12. Для исследования были взяты пробы сывороток крови и цельной крови, поступившие в референс-центр по мониторингу за лихорадкой Западного Нила в 2018 и 2019 гг. Всего было изучено 270 проб (152 пробы в 2018 г. и 118 проб в 2019 г.) от больных с предварительными диагнозами: вирусный энцефалит неуточненной этиологии, острая респираторная вирусная инфекция, менингит, острый гастроэнтерит. Антитела к вирусу Западного Нила (ВЗН) были обнаружены у 193 (71,4 %) пациентов, у 146 (54,0 %) был зарегистрирован только иммунный ответ без присутствия вирусной РНК. Оба маркера ВЗН присутствовали у 47 (17,4 %) пациентов. Только РНК ВЗН была выявлена в 14 (5,1 %) случаях. Таким образом, лабораторное подтверждение клинического диагноза ЛЗН было получено в 76,6 % случаев (207 из 270).

Ключевые слова: лихорадка Западного Нила, диагностика, иммуноферментный анализ (ИФА), полимеразная цепная реакция (ПЦР).

DOI 10.19163/1994-9480-2020-4(76)-42-45

THE INFORMATIVE VALUE OF IMMUNOLOGICAL AND GENETIC TESTS IN THE DIAGNOSIS WEST NILE FEVER

**T.V. Zamarina^{1,2}, N.P. Khrapova^{1,2}, I.A. Barkova¹, E.V. Pimenova^{1,2}, Y.A. Kuzyutina^{1,2},
G.A. Tkachenko^{1,2}, A.A. Baturin^{1,2}, L.V. Lemasova^{1,2},
M.L. Ledeneva¹, N.N. Teteryatnikova¹**

¹ FSHI «Volograd Research Anti-Plague Institute»;

² FSBEI HE «Volograd State Medical University»

of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation

We used ELISA and PCR for laboratory verification of West Nile fever (MUC 4.2.3009-12). We analyzed serum and whole blood samples which had been sent to West Nile fever reference monitoring centre in 2018–2019. A total of 270 blood samples obtained from patients with presumed viral encephalitis of unknown etiology, acute respiratory viral infection, acute respiratory viral infection, meningitis, acute gastroenteritis were analyzed. Antibodies against WNV were detected in 193 (71,4 %) blood samples, while 146 samples were found to be capable of developing an immune response with viral RNA not being detected in them. Both WNV antibodies and viral RNA were detected in 47 (17,4 %) samples tested. WNV RNA was detected in only 14 (5,1 %) cases. Thus, laboratory confirmation of WNF was obtained in 76,6 % of cases (207 out of 270).

Key words: West Nile fever, diagnostics, ELISA, PCR.

Лабораторное подтверждение клинического диагноза лихорадки Западного Нила (ЛЗН) заключается в обнаружении РНК вируса Западного Нила (ВЗН) с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и выявлении методом иммуноферментного анализа (ИФА) специфических антител в сыворотке крови больного. Обнаружение специфических антител до сих пор остается наиболее широко используемым подходом к диагностике ЛЗН у людей, в то время как вирусная РНК обнаруживается в крови больного в период от 5 до 15 дней от начала заболевания [2, 4, 5, 13].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Оценить информативность регламентированных диагностических методов при верификации диагноза лихорадки Западного Нила в биологическом материале, поступившем на исследование в референс-центр в 2018–2019 гг.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования явились 270 образцов сывороток крови и цельной крови от больных с предварительными диагнозами: вирусный энцефалит неуточненной этиологии, острая респираторная

вирусная инфекция, менингит, острый гастроэнтерит, поступившие в референс-центр (РЦ) в 2018 и 2019 гг. из Волгоградской, Астраханской, Ростовской, Воронежской, Тверской, Тульской, Липецкой областей, Ставропольского и Красноярского края, Республик Татарстан, Крым, Дагестан, Ханты-Мансийского автономного округа.

Для исследования методом ИФА в РЦ применяли тест-системы: «Anti-West Nile Virus ELISA (IgM)», «Anti-West Nile Virus ELISA (IgG)», «Avidity Anti-West Nile Virus (IgG) ELISA» («Euroimmun AG», Германия); РНК ВЗН определяли при помощи набора реагентов «АмплиСенс WNV-FL» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Специфические антитела были зарегистрированы у 193 (71,4 %) обследуемых. Только антитела (IgG, IgM) без выявления специфической РНК вируса Западного Нила были зафиксированы у 146 (54,0 %) пациентов. Вирусная РНК, совместно с присутствием антител классов IgG и IgM, определялась у 47 (17,4 %) человек, только РНК ВЗН – в 14 (5,1 %) случаях.

По данным ряда авторов, IgM к ВЗН обычно обнаруживаются в течение первой недели инфекции, иногда в продромальный период, и от 6 мес. до нескольких лет сохраняются в кровеносном русле, в спинномозговой жидкости – до 200 дней после инфицирования. IgG к ВЗН циркулируют в организме, как минимум, до 1,5 лет, хоть и с выраженным падением титров. Определение специфических IgG позволяет установить диагноз ЛЗН, диагностическим критерием является сероконверсия либо нарастание их титра в четыре и более раза к 3-й неделе после начала заболевания. Однако подтверждение лабораторного диагноза ЛЗН на основании четырехкратного нарастания титра специфических IgG не всегда возможно, поскольку концентрация антител при этом заболевании увеличивается достаточно быстро (в течение 1–2 суток) после проявления симптомов, а затем стабилизируется [6, 7, 10, 12].

В настоящей работе в случае обнаружения IgG к ВЗН в сыворотке крови больного проводили определение avidности антител этого класса. Известно, что низкоавидные антитела циркулируют в крови первые 2–3 месяца, а высокоавидные выявляют при давнем контакте с возбудителем ЛЗН. Tabain I. с соавт. с помощью «Avidity Anti-West Nile Virus (IgG) ELISA» («Euroimmun AG», Германия) было проведено исследование, в котором авторам удалось доказать, что величина индекса avidности IgG к ВЗН позволяет дифференцировать острую стадию инфекции, вызванную ВЗН, от более поздней стадии болезни,

причем для ЛЗН характерно быстрое «созревание avidности», что позволяет определять давность заболевания с точностью до месяца [9]. Всего avidность IgG против ВЗН была определена в 16 сыворотках крови. В IgM-положительных образцах avidность преимущественно имела низкие значения (до 40 %), в части сывороток – пограничные (от 40 до 60 %). В сыворотках крови, в которых обнаруживали IgG без присутствия IgM, avidность в большинстве случаев была высокой (выше 60 %). Данные результаты еще раз подтвердили, что avidность IgG позволяет отличить текущую/недавнюю инфекцию от персистирующей серопозитивности IgM, как у пациентов с выраженной симптоматикой заболевания, так и у лиц без симптомов.

Следует отметить, что биологический материал, полученный из различных регионов, в большинстве случаев направляли в РЦ только на основании клинической симптоматики. Несмотря на установление циркуляции ВЗН в 62 субъектах РФ, в большинстве выявление больных ЛЗН в эпидемический сезон не проводится. Это напрямую связано с отсутствием возможности проведения лабораторных исследований на ЛЗН, а если диагностика проводится, то она ограничивается обнаружением IgM антител, в редких случаях РНК.

На территории РФ разрешены к применению наборы реагентов для определения IgM к ВЗН: «Anti-West Nile Virus ELISA (IgM)» («Euroimmun AG», Германия), «БиоСкрин-ВЗН М» (ЗАО БТК «Биосервис», Россия), «ВектоНил-IgM» (ЗАО «Вектор-Бест», Россия). Несмотря на ряд проведенных исследований по определению диагностической значимости иммуноферментных наборов различных производителей для определения антител к ВЗН [1, 3, 8, 11], в настоящий момент нет единого мнения специалистов о наиболее эффективной иммунодиагностической тест-системе. В ходе работы было оценено количество совпадающих результатов, полученных в лабораториях регионов при использовании ИФА тест-систем для обнаружения IgM к ВЗН отечественного производства (ЗАО «Вектор-Бест» и ЗАО БТК «Биосервис»), и в РЦ с применением тест-системы «Euroimmun AG». Совпадение результатов исследований иммуноферментных тест-систем производства «Euroimmun AG» и ЗАО БТК «Биосервис» составило 84,6 %, а с набором производства ЗАО «Вектор-Бест» – 60 %. Такие результаты не позволяют судить о недостатках или преимуществах той или иной тест-системы. Необходим более глубокий анализ диагностической чувствительности и специфичности каждой из них, а также их способности давать устойчиво стабильный результат при тестировании референтных образцов.

Низкий процент обнаружения РНК ВЗН можно объяснить не только пропуском периода виремии,

который составляет от 2–3 до 14–18 дней [4, 5], но и нарушениями правил доставки биологического материала. Предположительно, при несоблюдении правил хранения и транспортировки материала происходит разрушение РНК, чувствительность тест-системы не позволяет выявить вирусный материал в столь низкой концентрации, что ведет к ложноотрицательным результатам. Анализ данных показал, что РНК вируса была обнаружена в материале, полученном из медицинских учреждений Волгоградской области и близлежащих регионов: Ростовской области, Ставропольского края, Астраханской области, Воронежской области, республики Крым. В то время как в материале от пациентов из Красноярского края, Тюменской области, Тверской области и РНК ВЗН выявлено не было.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для дифференциальной и ретроспективной диагностики лихорадки Западного Нила рекомендуется использовать комплексный подход, который заключается в параллельном использовании двух методов: прямого обнаружения РНК вируса с помощью ПЦР и в серологическом исследовании антител в ИФА. Такой подход обусловлен разными временными рамками образования специфических маркеров и ограниченным нахождением вируса в кровяном русле, а также для исключения ложноположительных результатов и перекрестных реакций с другими флавивирусами. Таким образом, антитела к вирусу Западного Нила (ВЗН) были обнаружены у 193 (71,4 %) пациентов, у 146 (54,0 %) был зарегистрирован только иммунный ответ без присутствия вируса РНК. Оба маркера ВЗН присутствовали у 47 (17,4 %) пациентов. Только РНК ВЗН была выявлена в 14 (5,1 %) случаях. Подтверждение клинического диагноза ЛЗН было получено в 76,6 % случаев (207 из 270). Достоверность постановки диагноза ЛЗН повышает только одновременное обнаружение нескольких специфических маркеров, поэтому на любой стадии заболевания необходимо использовать комплекс базовых иммуно- и генодиагностических методов. Более достоверные результаты могут быть получены при одновременном исследовании референтных образцов с применением различных тест-систем в одинаковых условиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Азарян А.Р., Гришанова А.П., Иващенко Е.И. и др. Опыт применения ИФА тест-систем для серологической диагностики лихорадки Западного Нила // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2014. – № 2. – С. 59–62.
2. Говорухина М.В., Асмолова Н.Ю., Мазрухо Т.В. и др. Использование молекулярно-биологических методов в лабораторной диагностике лихорадки Западного Нила // Материалы X съезда ВНПОЭМПИ. Москва 12–13 апреля 2012. – М., 2012. – С. 132.

3. Дрефс Н.М. Сравнительная характеристика тест-систем, предназначенных для выявления иммуноглобулинов к возбудителю Лихорадки Западного Нила // Вестник ВолгМУ. – 2012. – Вып. 2 (42). – С. 36–38.

4. Красовская Т.Ю., Найденова Е.В., Казанцев А.В. и др. Результаты использования комплексного подхода к лабораторной диагностике лихорадки Западного Нила // Материалы IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика 2017». Москва, 18–20 апреля 2017. – М.: ООО «Юлис», 2017. – С. 178–179.

5. Лихорадка Западного Нила / под ред. д-ра мед. наук А.В. Топоркова. – Волгоград: Издательство «Волга-Пресс», 2017. – 304 с.

6. Barzon L., Pacenti M., Franchin E., et al. Excretion of West Nile virus in urine during acute infection // J Infect Dis. – 2013. – Vol. 208 (7). – P. 1086–1092. – doi:10.1093/infdis/jit290.

7. Murray K.O., Garcia M.N., Yan C., Gorchakov R. Persistence of detectable immunoglobulin M antibodies up to 8 years after infection with West Nile virus // Am J Trop Med Hyg. – 2013. – Vol. 89 (5). – P. 996–1000. doi:10.4269/ajtmh.13-0232.

8. Niedrig M., Donoso Mantke O., Altmann D., Zeller H. First international diagnostic accuracy study for the serological detection of West Nile virus infection // BMC Infect Dis. – 2007. – Vol. 7. – P. 72. – Published 2007 Jul 3. – doi:10.1186/1471-2334-7-72.

9. Papa A., Anastasiadou A., Delianidou M. West Nile virus IgM and IgG antibodies three years post-infection // Hippokratia. – 2015. – Vol. 19 (1). – P. 34–36.

10. Rizzoli A., Jimenez-Clavero M.A., Barzon L., et al. The challenge of West Nile virus in Europe: knowledge gaps and research priorities // Euro Surveill. – 2015. – Vol. 20 (20). – P. 21135. – Published 2015 May 21. – doi:10.2807/1560-7917.es2015.20.20.21135.

11. Sanchini A., Donoso-Mantke O., Papa A., et al. Second International Diagnostic Accuracy Study for the Serological Detection of West Nile Virus Infection. 2013 // PLOS Neglected Tropical Disease. – 2013. – Vol. 7, Is. 4. – e2184.

12. Tabain I., Vilibić-Čavlek T., Kristofic B., et al. The role of IgG avidity determination in diagnosis of West Nile virus infection. Abstracts // International Journal of Infectious Diseases. – 2019. – Vol. 79 (S1). – P. 1–150. – doi.org/10.1016/j.ijid.2018.11.287.

13. Zamarina T.V., Khrapova N.P., Tkachenko G.A., et al. Application of a complex of methods in laboratory diagnostics of West Nile fever // Russian Journal of Infection and Immunity. – 2018. – Vol. 8, no. 4. – P. 125. – doi: 10.15789/2220-7619-2018-4-2.22.

REFERENCES

1. Azaryan A. R., Grishanova A. P., Ivashchenko E. I., et al. Opyt primeneniya IFA test-sistem dlja serologicheskoy diagnostiki lihoradki Zapadnogo Nila [Experience of using ELISA test systems for serological diagnosis of West Nile fever]. *Jepidemiologija i infekcionnye bolezni* [Epidemiology and infectious diseases], 2014, no. 2, pp. 59–62. (In Russ.; abstr. in Engl.).
2. Govorukhina M. V., Asmolova N. Yu., Mazrukho T. V., et al. Ispol'zovanie molekulyarno-biologicheskikh metodov v laboratornoj diagnostike lihoradki Zapadnogo Nila [Use of molecular biological methods in laboratory diagnostics of West Nile fever]. *Materialy X s'ezda VNPOJeMPI. Moskva*

12–13 *aprelja* 2012 [Materials of X Congress of NOEMI. Moscow 12–13 April 2012]. Moscow, 2012, p. 132. (In Russ.; abstr. in Engl.).

3. Drefs N. M. Sravnitel'naja karakteristika test-sistem, prednaznachennyh dlja vyjavlenija immunoglobulinov k vozбудitelju Lihoradki Zapadnogo Nila [Comparative characteristics of test systems designed to detect immunoglobulins to the West Nile Fever pathogen]. *Vestnik VolgMU* [Journal of Volgograd State Medical University], 2012, is. 2 (42), pp. 36–38. (In Russ.; abstr. in Engl.).

4. Krasovskaya T. Yu., Naydenova E. V., Kazantsev A.V. et al. Rezul'taty ispol'zovanija kompleksnogo podhoda k laboratornoj diagnostike lihoradki Zapadnogo Nila [Results of using a comprehensive approach to the laboratory diagnosis of West Nile fever]. *Materialy IH Vserossijskoj nauchno-praktičeskoj konferencii s mezhdunarodnym uchastiem «Molekuljarnaja diagnostika 2017»* [Materials of the IX all-Russian scientific and practical conference] Moscow, 18–20 April 2017. Moscow: OOO «Julis», 2017, pp. 178–179. (In Russ.; abstr. in Engl.).

5. Lihoradka zapadnogo Nila [West Nile fever]. Ed. Dr. med. D. A. V. Toporkov. Volgograd: Publishing house «Volga-Press», 2017. 304 p. (In Russ.; abstr. in Engl.).

6. Barzon L., Pacenti M., Franchin E., et al. Excretion of West Nile virus in urine during acute infection. *J Infect Dis*, 2013, vol. 208 (7), pp. 1086–1092. doi:10.1093/infdis/jit290.

7. Murray K.O., Garcia M.N., Yan C., Gorchakov R. Persistence of detectable immunoglobulin M antibodies up to 8 years after infection with West Nile virus.

Am J Trop Med Hyg, 2013, vol. 89 (5), pp. 996–1000. doi:10.4269/ajtmh.13-0232.

8. Niedrig M., Donoso Mantke O., Altmann D., Zeller H. First international diagnostic accuracy study for the serological detection of West Nile virus infection. *BMC Infect Dis*, 2007, vol. 7, p. 72. Published 2007 Jul 3. doi:10.1186/1471-2334-7-72.

9. Papa A., Anastasiadou A., Delianidou M. West Nile virus IgM and IgG antibodies three years post-infection. *Hippokratia*, 2015, vol. 19 (1), pp. 34–36.

10. Rizzoli A., Jimenez-Clavero M.A., Barzon L., et al. The challenge of West Nile virus in Europe: knowledge gaps and research priorities. *Euro Surveill*, 2015, vol. 20 (20), p. 21135. Published 2015 May 21. doi:10.2807/1560-7917.es2015.20.20.21135.

11. Sanchini A., Donoso-Mantke O., Papa A., et al. Second International Diagnostic Accuracy Study for the Serological Detection of West Nile Virus Infection. 2013. *PLOS Neglected Tropical Disease*, 2013, vol. 7, Is. 4, e2184.

12. Tabain I., Vilibić-Čavlek T., Kristofic B., et al. The role of IgG avidity determination in diagnosis of West Nile virus infection. Abstracts. *International Journal of Infectious Diseases*, 2019, vol. 79 (S1), pp. 1–150. – doi.org/10.1016/j.ijid.2018.11.287.

13. Zamarina T.V., Khrapova N.P., Tkachenko G.A., et al. Application of a complex of methods in laboratory diagnostics of West Nile fever. *Russian Journal of Infection and Immunity*, 2018, vol. 8, no. 4, p. 125. doi: 10.15789/2220-7619-2018-4-2.22.

Контактная информация

Замарина Татьяна Валерьевна – к. м. н., старший научный сотрудник лаборатории иммунодиагностики ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора», e-mail: bultan@inbox.ru